

Recherches sur l'activité anticancéreuse d'un nouvel agent alcoylant de synthèse, le trenimon

par J. JACQUET

Nous avons eu l'occasion récemment de montrer (6) comment des études initiales des troubles et lésions produites par l'ypérite et dans lesquelles les vétérinaires français (MARCENAC, MAGNE, CORDIER, LUCAM) ont pris une part éminente, puis du véritable démontage biochimique des effets moléculaires réalisés par cette substance alcoylante et son analogue à l'azote, sont issues toute une série de substances utilisées actuellement dans le traitement de certains cancers et des néphropathies à étiologie immunologique. Il est extrêmement curieux de constater en tout cas, avec quelle précision, quelle régularité, quelle exactitude, de chaque théorie explicative du mode d'action des vésicants, sont sorties des séries de corps de synthèse, tels que les porteurs de groupement β -chloréthyl sur un radical aliphatique ou aromatique (dégranol, nitromin, chlorambucil) — les esters sulfoniques (mylérane, endoxan) — les époxydes (épodyl) — enfin, les éthylènes imoniums.

Parmi ces derniers, ADAM (1) et LOMBARD (10) ont montré l'intérêt du E 39 Bayer, ou bis méthoxy-2-éthoxy-2-5 bis (éthylène imino) 3-6 benzoquinone 1-4. Il se montre capable de faire rétrocéder totalement chez le bœuf l'épidermisation conjonctivale et l'épithélioma superficiel débutant du limbe oculaire, évitant ainsi l'énucléation. Par ailleurs, dans la même catégorie, le trénimon ou triéthylène-imino 2-3-5 benzoquinone 1-4, qui fera l'objet de cette note, mérite une considération spéciale, car on a réussi sur lui à greffer le maximum (trois) de composants actifs éthylèneimoniums et, de ce point de vue, il est supérieur à son analogue précédent, le E 39 qui n'en possédait que deux (2). Aussi, constate-t-on qu'il se révèle cyto-statique sur cultures de fibroblastes de poulet à la dose très faible de 0,5 $\mu\text{g/ml}$, alors qu'il faut une concentration dix fois plus élevée de E 39 pour produire le même effet. Par ailleurs, 260 $5\text{g}/\mu\text{g}$ du premier injectés sous la peau de souris, inhibent, en 5 jours, à plus

de 75 p. 100 la croissance du sarcome 180 et de l'adénocarcinome mammaire R III. Par voie intrapéritonéale, la même quantité produit une diminution des lésions histologiques et un retard important de mortalité des sujets atteints de leucémie AKR ou porteurs d'ascite d'Ehrlich. Malheureusement, la toxicité croît aussi, et la dose léthale à 50 p. 100 pour les souris traitées par voie intrapéritonéale pendant 5 jours passe de 15 mg/kg avec le E 39 à 0,225 mg/kg avec le tréni-mon.

Continuant nos travaux sur la chimiothérapie anticancéreuse (4), (5) à l'aide de l'épithélioma T 8 de Guérin dont on connaît tout l'intérêt comme modèle pathologique expérimental (3), nous avons adopté le protocole suivant, dont nous avons déjà précisé les raisons (4), (5) : des fragments d'épithélioma T 8 de 1 mm de côté, choisis de préférence dans une même métastase ganglionnaire, ou à défaut, dans une partie non nécrosée de la même tumeur principale, sont placés sous la peau du dos de rats Wistar. Il est important de noter que la greffe, en une autre partie du corps, notamment au niveau de la cuisse, donnerait des résultats nettement différents. Il est surtout essentiel de ne pas sortir de la race précitée, car nous avons montré récemment (7), l'importance considérable de ce facteur, l'ensemble hôte-tumeur formant un complexe réactionnel indissociable en cancérologie expérimentale.

Les animaux sont pesés chaque semaine et les diamètres des tumeurs notés. Au moment de la mort, ou mieux de l'agonie, les autopsies pratiquées permettent de connaître le poids de la tumeur sous-cutanée greffée, le nombre et la situation des métastases, le poids de ces dernières. Il nous apparaît, enfin, absolument fondamental de ne pas raisonner sur le volume relatif des tumeurs et des métastases, par rapport aux animaux témoins, sans tenir compte du temps de survie correspondant. On risque, autrement, d'attribuer au médicament des effets qui ne sont dus, en fait, qu'à la prolongation, ou au contraire, au raccourcissement de l'existence. L'amaigrissement est estimé, comparativement, d'un lot à l'autre, selon les méthodes préalablement exposées (4) : nous retranchons, du poids noté au moment de la mort du rat, la masse de la tumeur cancéreuse hypodermique ; le reste, qui constitue la carcasse proprement dite, servira à établir combien ce corps a perdu de poids depuis le jour de la greffe. Bien sûr, on peut critiquer cette façon de faire ; mais, comme nous calculons les moyennes de tous nos lots de cette façon, les comparaisons de l'un à l'autre restent acceptables. Pour ceux qui n'admettraient pas ce principe, nous avons fait figurer la variation brute du poids entre le moment de la greffe et la mort, précédée d'une croix en cas d'engraissement, d'un trait en cas d'amaigris-

sement. Nous avons procédé de même pour les carcasses, et si elles ont pris de la substance, au lieu d'en perdre, leur taux de croît sera précédé du signe +.

RÉSULTATS DES EXPÉRIENCES

1. Le trénimon a été utilisé par voie sous-cutanée, tout d'abord, à dose assez faible ou moyenne, de l'ordre de 0,25 mg pour un traitement total réparti, selon les cas, en 5, 10, 20 jours. La dose léthale étudiée par voie péritonéale est de 0,25 mg/kg. Le début des injections n'a lieu que lorsque les tumeurs apparues sont bien palpables.

Des essais antérieurs nous ayant montré que le cancer de Guérin était sensible aux rayons X (9) et aux antifoliques comme l'Améthoptérine (4), nous avons tenté des associations thérapeutiques.

Nos résultats, figurés dans le tableau I, montrent l'effet bénéfique évident pour la moyenne des animaux de cette combinaison, tant en ce qui concerne la durée de vie, que la taille des tumeurs principales et des métastases (colonne 4 du tableau). Mais, comme nous l'avons déjà aperçu pour un antibiotique antimétabolique, la rufochromomycine (5), c'est dans deux autres lots, dont l'ensemble est moins amélioré, que nous avons obtenu les résultats individuels spectaculaires : une guérison et une rémission tumorale complète d'une assez longue durée. La première s'est produite au bout de 51 jours sur un rat dont la tuméfaction atteint au 22^e jour, des dimensions de $2,8 \times 2,7$ cm. L'animal vécut, ensuite, 1 an, 6 mois et 23 jours. A l'autopsie, nous découvrîmes une énorme masse interne, sans métastases apparentes, liant ensemble les viscères abdominaux, parmi lesquels la rate hypertrophiée ($6,5 \times 1,4$ cm). Les coupes établirent qu'il s'agissait d'un fibrosarcome, assez vascularisé, avec quelques foyers de nécrose, et infiltration en quelques points de globules blancs et surtout de plasmocytes. Nous décidâmes de rechercher par greffe à 10 nouveaux rats Wistar sains si ce cancer pouvait être repassé. Aucune greffe ne reprit. Nous pensons avoir eu affaire là à une véritable guérison, puisque le rat put, très longtemps après, être atteint d'une autre tumeur maligne très différente et dont on sait qu'elle est relativement fréquente spontanément sur la lignée des rats Wistar, formant l'immense majorité des 3,1 p. 100 de cancers que l'on y dépiste (11). L'autre disparition tumorale eut lieu dans le groupe d'animaux qui reçut le trénimon à la dose totale toujours constante de 0,25 mg/kg, mais étalée seulement sur 5 jours : la tumeur dorsale d'un sujet parvint, lors de son développement maximal, à $2 \times 1,5$ cm, le 22^e jour. Elle était résorbée le 62^e jour après

TABLEAU I

	Lot témoin	12,5 µg/kg (20 jours)	12,5 µg/kg (20 jours) + 0,3 mg métho- trexate (8 jours)	12,5 µg/kg (20 jours) + 0,3 mg métho- trexate (8 jours) + 2.000 r	25 µg/kg (10 jours)	50 µg/kg (5 jours)	25 µg/kg (20 jours)
Nombre d'animaux en expérience....	8	4	4	4	4	4	4
Nombre d'animaux cancéreux.....	8	3	3	4	4	4	4
Poids moyen des animaux au début des essais, en g.....	152,5	158,3	137,5	140	145	163	186,25
Poids moyen des animaux à la fin des essais, en g.....	236,25	235	180	201,25	223,8	233	201,25
Variation brute du poids du corps, en g.....	+ 83,75	+ 76,7	+ 42,5	+ 61,25	+ 78,8	+ 15	+ 70
Amaigrissement de la carcasse, en g..	3,45	+ 13,1	17,4	+ 33,15	+ 14,6	40,1	+ 22
Nombre de jours vécus depuis la greffe.....	50	63	66	80	59	54	52
Nombre de jours vécus depuis l'apparition de tumeurs palpables.....	39	52	55	69	48	43	41
Poids moyen de la tumeur principale sous-cutanée, en g.....	87,20	63,4	59,9	28,1	64,2	55,1	48
Pourcentage de la tumeur par rapport au poids de l'animal.....	6,1	27	33,3	1,4	28,7	23,7	23,9
Poids moyen des métastases, en g....	18,2	17,1	2,75	12,1	14,3	29,5	4,3
Poids moyen des tissus apparemment cancéreux, en g.....	105,4	80,5	62,65	40,2	78,5	84,6	52,3
Pourcentage de tissus cancéreux par rapport au poids de l'animal.....	48,9	34,3	34,8	20	35	36,3	26
Dose totale des médicaments :							
• trénonim en mg/kg.....	néant	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
• méthotrexate en mg.....			2,4	2,4			
• rayons X en roentgens.....				2.000			
Observations.....			1 guérison survie de 1 an 6 mois 23 jours (fibrosar- come abdominal)			1 rémission survie de 7 mois 10 jours	

la greffe. L'animal vécut encore 7 mois 10 jours. A l'ouverture de sa poitrine, une masse de 3×3 cm, repoussait les poumons : elle avait toujours histologiquement la structure de l'épithélioma T 8. Là encore, nous en tentâmes le passage qui, cette fois, réussit, à de nouveaux animaux, et les moyennes de nos mensurations en étaient presque toutes supérieures aux normes moyennes habituelles que nous avons calculées sur plus de 400 sujets, soit, cette fois, une survie moyenne de 67 jours, au lieu de 39, un poids moyen des tumeurs principales de 95,9 g au lieu de 56,7 g et des métastases de 9,6 g au lieu de 10,7 g (8).

La figure 1, qui précise par rapport au temps, la réduction des diamètres moyens des tumeurs des différents lots de rats, les cas de rémission étant exclus de la statistique, montre bien l'effet dépressif évident du trénimon sur la croissance de l'épithélioma T 8 et l'intérêt relatif des associations médicamenteuses.

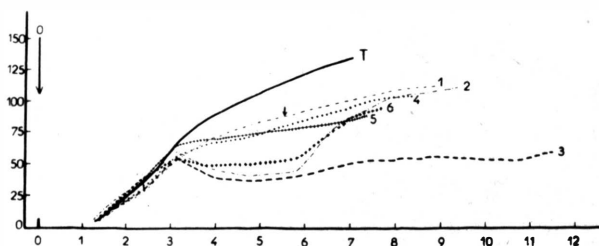


FIG. 1. — Développement linéaire moyen des tumeurs dorsales, de différents lots.

En abscisses, le temps en semaines.

En ordonnées, la somme de la longueur et de la largeur des tumeurs en mm.

Ligne T : rats témoins.

Lot 1 : sujets qui ont reçu 0,25 $\mu\text{g/kg}$ de trénimon pendant 20 jours consécutifs.

Lot 2 : rats qui ont reçu la même posologie de trénimon que le lot 1, plus 0,3 mg de méthotrexate par rat pendant 8 jours.

Lot 3 : rats qui ont reçu les mêmes médicaments que le lot 2 et une radiothérapie de contact (2.000 r).

Lot 4 : rats traités avec 25 $\mu\text{g/kg}$ de trénimon pendant 10 jours.

Lot 5 : rats à qui on a injecté 50 $\mu\text{g/kg}$ pendant 5 jours.

Lot 6 : rats à qui on a injecté 25 $\mu\text{g/kg}$ pendant 20 jours.

2. Dans une deuxième série d'expériences, nous avons recherché l'action de posologies croissantes (étude déjà amorcée précédemment : ligne 7 du tableau I) et c'est ainsi que nous avons employé des doses totales de 0,5-1-2 mg. Les résultats sont rassemblés dans le tableau II.

TABLEAU II

	Lot témoin	100 µg/kg (5 jours)	100 µg/kg (10 jours)	200 µg/kg (5 jours)	100 µg/kg (20 jours)	200 µg/kg (10 jours)
Nombre d'animaux cancéreux en expérience...	8	6	6	6	6	6
Poids moyen des animaux au début des essais, en g	157,5	220	195	240	242,5	205
Poids moyen des animaux à la fin des essais, en g	225	195	162,5	177,5	230	262,5
Variation brute du poids du corps, en g.....	+ 67,5	+ 5	— 32,5	— 62,5	— 12,5	+ 62,5
Amaigrissement de la carcasse, en g.....	+ 35	41,35	51,1	100,4	61,25	+ 20,5
Nombre de jours vécus depuis la greffe.....	41	47	42	74	73	54
Nombre de jours vécus depuis l'apparition de tumeurs palpables.....	29	35	32	62	61	42
Poids moyen de la tumeur principale sous-cuta- née, en g	32,5	46,35	18,6	37,9	48,75	45,5
Pourcentage de la tumeur par rapport au poids de l'animal	14,4	23,8	11,4	21,4	27	17,3
Poids moyen des métastases, en g.....	52,6	2,05	2,3	0,2	3,25	8,3
Poids des tissus apparemment cancéreux, en g..	85,1	48,4	20,9	38,1	52	53,8
Pourcentage de tissus cancéreux, par rapport au poids de l'animal	37,8	24,8	12,9	21,5	28,9	20,5
Dose totale du médicament, en mg/kg.....	néant	0,5	1	1	2	2

Une première notion ressort immédiatement de la comparaison des colonnes 2 et 6 : des posologies mal adaptées, surtout trop faibles ou de courte durée, sont souvent aggravantes ; elles ne font que gêner les défenses de l'organisme, sans arrêter en elle-même l'évolution cancéreuse proprement dite. Dans le cas particulier de cet essai, sur les témoins, on a affaire à une tumeur qui se développe moins bien que la moyenne habituelle (moyennes de tumeurs de 32,5 g au bout de 41 jours, au lieu de 50 g dans nos statistiques d'ensemble [8]). En revanche, les métastases y sont beaucoup plus grosses et atteignent 52,6 g au lieu de rester à 10,67 g. C'est un exemple de ce balancement tumeur principale-métastases que l'épithélioma T 8 a tendance à montrer souvent.

On peut, cependant, calculer ce qu'aurait donné sur les témoins une prolongation de vie de 6 jours, comme sur le lot expérimental de la colonne 2 du tableau II. L'estimation reste nettement au-dessous de ce qu'a produit le tréminon injecté à la dose totale de 0,5 mg par kg vif ; si le médicament a bloqué d'une façon significative les métastases, il a, en revanche, aggravé la cancérisation primitive sous-cutanée. Quant à la posologie utilisée dans la dernière colonne (dose totale de 2 mg/kg, soit 200 μ g/kg pendant 10 jours), on constate qu'elle a allongé la durée d'existence des animaux, mais n'a rien fait sur les tumeurs elles-mêmes : les témoins, s'ils avaient vécu aussi longtemps, auraient eu des tuméfactions du même ordre de poids.

Partout, les rats traités ont des métastases faibles, constatation d'autant plus claire que, dans le cas particulier, les greffons employés avaient tendance à les exagérer. On peut même dire que c'est cette inhibition qui a permis à certains rats d'avoir des survies nettement allongées (73 à 74 jours au lieu de 41).

L'amélioration tumorale est évidente, aussi, avec les posologies moyennes : diminution des tuméfactions (57,2 p. 100 de celles des témoins pour les animaux de la colonne 3). Ce blocage est tout aussi important, d'ailleurs, pour les sujets des colonnes 4 et 6, si l'on tient compte du temps de vie très prolongé des animaux. Mais, de toutes façons, nous n'avons obtenu aucune rémission complète du processus malin, aucune disparition totale de tumeur. Aussi, avons-nous essayé de revenir aux posologies de départ.

3. Nos nouvelles tentatives sont représentées dans le tableau II qui rassemble, en réalité, trois essais successifs, chacun doté de son lot témoin auquel il faut comparer les lots expérimentaux correspondants. Avec 50 μ g/kg pendant 10 jours, nous obtînmes une guérison définitive : le rat qui en a bénéficié avait porté une tumeur qui était parvenue à un diamètre de 1,8 cm le 23^e jour et qui disparut

TABLEAU III

	1			2		3	
	Lot témoin n° 1	50 µg/kg (10 jours)	50 µg/kg (10 jours) = 0,3 mg métho- trexate (10 jours)	Lot témoin n° 2	50 µg/kg (20 jours) = 0,3 mg métho- trexate (10 jours)	Lot témoin n° 3	50 µg/kg (10 jours) = 0,3 mg métho- trexate (8 jours)
Nombre d'animaux cancéreux en expé- rience	8	4	7	8	9	8	9
Poids moyen des animaux au début des essais, en g	178,75	143	173	197	190	187,5	180
Poids moyen des animaux à la fin des essais, en g	221,25	175	222	226	170	181	154,3
Variation brute du poids, en g	+ 42,50	+ 32	+ 49	+ 29	- 20	- 6,5	- 35,7
Amaigrissement de la carcasse, en g	- 32,7	- 20,8	- 19,8	- 38,7	- 33	- 51,2	- 42,6
Nombre de jours vécus depuis la greffe....	42	52	64	38	48	37	35
Nombre de jours vécus depuis l'apparition de tumeurs palpables	35	45	52	28	38	23	21
Poids moyen de la tumeur principale sous- cutanée, en g	75,2	52,8	62,8	67,7	11	44,7	6,9
Pourcentage de la tumeur par rapport au poids de l'animal	34	30,2	28,2	30	6,5	24,7	4,5
Poids moyen des métastases, en g	8,5	8,4	21,6	5	6	9,8	0,5
Poids moyen des tissus apparemment can- céreux, en g	83,7	61,2	84,4	72,7	17	54,5	7,4
Pourcentage de tissus cancéreux par rap- port au poids de l'animal	37,9	35	38	32,2	10	30,1	4,8
Dose totale des médicaments :							
• trénimon en mg/kg	0	0,5	0,5	0	1	0	0,5
• méthotrexate en mg			3		3		2,4
Observations		1 guérison : survie de 1 an 7 mois 29 jours			2 régres- sions tumorales totales		1 régression tumorale totale

le 35^e. Il vécut, ensuite, pendant 1 an, 7 mois et 29 jours et mourut de pneumonie aiguë. Aucune trace de tumeur ne fut trouvée dans son organisme.

La combinaison de 10 jours de traitement au trénimon à raison de 50 $\mu\text{g/kg}$ avec le méthotrexate (colonne 3) produisit une constante diminution des tumeurs figurées sur le schéma 2 et qui, pour cinq sujets sur sept, a vraiment donné l'impression d'avoir été très proche du succès; et puis, le cancer est reparti, échappant irrémédiablement et refaisant une courbe de croissance qui entraîna la mort des rats.

En augmentant la durée d'action du trénimon (5^e colonne), on n'arrive encore qu'à deux disparitions totales de la tumeur principale sur les neuf animaux en expérience : les deux tumeurs mesuraient $1,5 \times 1,5$ cm le 19^e jour et disparurent le 49^e et le 50^e jour. Mais les animaux ne purent survivre bien longtemps : l'amaigrissement notable, alors que les lots précédents engraisaient, au moins apparemment, souligne l'effet de nocivité. En tout cas, un de ces rats mourut dès le 50^e jour, l'autre le 107^e jour. Ni l'un, ni l'autre n'avaient, alors, de métastases.

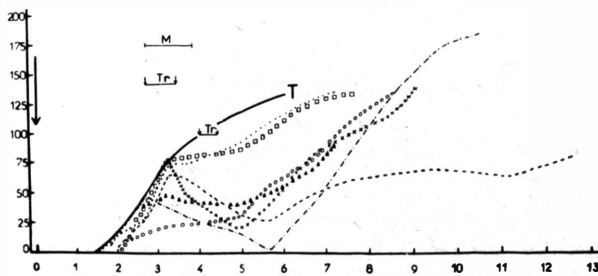


FIG. 2. — Courbes individuelles de croissance des tumeurs des rats des colonnes 4 et 3 du groupe 1 du tableau III.

En abscisses, le temps en semaines.

En ordonnées, la somme de la longueur et de la largeur des tumeurs en mm.

M = temps d'utilisation du méthotrexate à raison de 0,3 mg par rat et par jour.

Tr = temps d'utilisation du trénimon à raison de 50 $\mu\text{g/kg}$ par rat et par jour.

4. Dans une dernière expérience (colonnes 6 et 7 du tableau III), nous nous proposâmes un but très particulier : rechercher l'action encore possible d'une thérapeutique commencée tardivement, le 24^e jour après la greffe, comme c'est le cas trop souvent, hélas, en clinique. Toutes les actions obtenues sont insuffisantes, mais toujours évidentes. Il y eut encore une régression totale de tumeur, au 34^e jour, alors qu'au 26^e jour, celle-ci mesurait $2,5 \times 2$ cm. Le

porteur mourut, cependant, presque en même temps (le 36^e jour). Son cadavre, dont la rate hypertrophiée ($4,5 \times 2$ cm), ne contenait aucune métastase.

CONCLUSIONS

L'un des derniers venus des agents alcoylants de synthèse de la classe des éthylène imine quinones, le trénimon, se révèle constamment actif sur l'épithélioma T 8 de Guérin greffé sur rats Wistar, dont il réduit les dimensions des tumeurs et l'importance des métastases, tout en prolongeant le temps de survie d'une façon importante. Deux guérisons et une rémission de longue durée, quelques fontes de tumeurs principales ont été obtenues.

Tout ceci doit inciter à continuer les recherches dans la voie pleine de promesses de la chimiothérapie anticancéreuse, à laquelle les vétérinaires devraient très activement s'associer, comme, d'une façon générale, pour tout ce qui a trait à la cancérologie.

(Laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de Caen.)

BIBLIOGRAPHIE

1. E. ADAM. — *Vét. Med. Woch.*, 1956, **81**, 101-110.
 2. G. DOMAGK. — *Münch. Med. Woch.*, 1960, **17**, 857-863.
 3. J. JACQUET. — *Rev. Path. Gén.*, 1963, **63**, 401-440.
 4. — *Bull. Acad. Vét.*, 1963, **36**, 447-462.
 5. — *Rev. Immuno.*, 1965, **29**, 321-366.
 6. — *Rev. Serv. Biol. et Vét. des Armées*, 1966, **19**, 149-159.
 7. — *C. R. Acad. Sc.*, 1966, **263**, 1284-1286.
 8. J. JACQUET et M^{lle} S. SAINT. — *Bull. Cancer*, 1966 (*en cours de parution*).
 9. J. JACQUET, P. JACOB, S. ABBATUCCI et G. LETOURNEUR. — *Bull. Cancer.*, 1961, **48**, 411-420.
 10. C. LOMBARD. — *C. R. Acad. Sc.*, 1966, **262**, 1813-1816.
 11. RATCLIFFE. — *Amer. J. Path.*, 1940, **16**, 237-255.
-